

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
12. September 2003 (12.09.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 03/074546 A2

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>:

C07K

(21) Internationales Aktenzeichen:

PCT/DE03/00605

(22) Internationales Anmeldedatum:

20. Februar 2003 (20.02.2003)

(25) Einreichungssprache:

Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache:

Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:

102 08 877.2 1. März 2002 (01.03.2002) DE  
102 48 318.3 16. Oktober 2002 (16.10.2002) DE

(71) Anmelder: ERDMANN, Volker, A. [DE/DE]; Argentinische Allee 2, 14163 Berlin (DE).

(71) Anmelder und

(72) Erfinder: LAMLA, Thorsten [DE/DE]; Thielallee 63, 14195 Berlin (DE).

(74) Anwälte: JUNGBLUT, Bernhard usw.; Albrecht, Lüke & Jungblut, Gelfertstr. 56, 14195 Berlin (DE).

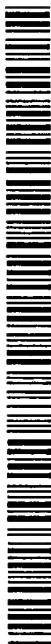
(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.



WO 03/074546 A2

(54) Title: STREPTAVIDIN-BINDING PEPTIDE

(54) Bezeichnung: STREPTAVIDIN-BINDUNGSPEPTID

(57) Abstract: The invention relates to novel streptavidin-binding peptides.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung lehrt neue Streptavidin-Bindungspeptide.

## Streptavidin-Bindungspeptid

## Gebiet der Erfindung

5 Die Erfindung betrifft ein Streptavidin-Bindungspeptid, sowie Verfahren zur Herstellung eines Streptavidin-Bindungspeptides in einem zellbasierten oder zellfreien Proteinbiosynthesesystem.

10 Weiterhin betrifft die Erfindung eine Verwendung eines Streptavidin-Bindungspeptides zur Aufreinigung eines in einem Proteinbiosynthesesystem hergestellten definierten Proteins, sowie die Verwendung eines Streptavidin-Bindungspeptides zur Markierung eines definierten Proteins.

## 15 Stand der Technik

Verfahren zur effizienten Expression von definierten Proteinen in verschiedensten pro- und eukaryontischen Organismen sind bekannt und bedürfen keiner weiteren Erläuterung. Unter definierten Proteinen werden in diesem Zusammenhang Peptide und/oder Proteine verstanden, die in dem zur Expression verwendeten Organismus oder zellfreien Expressionssystem natürlicherweise oder nach Transformation bzw. Einsatz definierter RNA exprimiert und in Aufreinigungsschritten angereichert werden.

Verfahren zur zellfreien Expression von definierten Proteinen sind beispielsweise aus den Literaturstellen EP 0312 617 B1, EP 0401 369 B1 und EP 0 593 757 B1 bekannt. 30 Demgemäß werden die für eine Transkription und/oder Translation notwendigen Komponenten neben einem für ein definiertes Protein kodierenden Nukleinsäurestrang in einem Reaktionsgefäß inkubiert und nach der Expression die

Polypeptide/Proteine aus der Reaktionslösung isoliert. Sowohl die für die Transkription, als auch die für die Translation notwendigen Komponenten lassen sich aus den Überständen pro- oder eukaryontischen Zelllysaten nach 5 einer Zentrifugation gewinnen.

Ein wesentliches Problem bei der Expression von definierten Proteinen in pro- und eukaryontischen Organismen und bei der zellfreien Expression liegt in der Aufreinigung 10 und/oder der Detektion der exprimierten definierten Proteine. Dies ist insbesondere bei definierten Proteinen problematisch, für die es keine Antiseren oder monoklonale Antikörper gibt. Zur Vereinfachung der Aufreinigung und der Detektion solcher definierten Proteine werden diese 15 als sogenannte Fusionsproteine exprimiert. Hierbei wird dem definierten Protein N- und/oder C-terminal eine Aminosäuresequenz angefügt oder zwischen zwei Proteindomänen (intern) eingefügt, der Fusionspartner. Dies geschieht auf der Nukleinsäureebene, so daß sowohl das definierte Protein 20 in, als auch der zur Detektion und/oder Reinigung angefügten Fusionspartner während eines Transkriptions-/Translationsvorganges zusammen als ein chimäres (Fusions-) Protein exprimiert werden, bestehend aus dem definierten Protein und dem Fusionspartner. Hierbei kann es sich bei dem ange- 25 fügten Fusionspartner um einzelne Aminosäuren, aber auch um Peptide oder Proteine handeln. Für diese angefügten Fusionspartner stehen zur Aufreinigung immobilisierte Bindungspartner zur Verfügung, mit denen die Fusionsproteine isoliert werden können. Neben der Möglichkeit der Reini- 30 gung der Proteine können diese auch mit für den Fusionspartner spezifischen Bindungspartner nachgewiesen werden. Diese Bindungspartner können für den Fusionspartner spezi- fische Antikörper oder auch andere Proteine, Peptide oder

chemische Verbindungen sein, die an den Fusionspartner spezifisch binden.

Beispiele für solche Fusionspartner sind der Myc-tag (Munro & Pelham (1986) Cell 46, 291-300; Ward et al. (1998) Nature 341, 544-546), das Flag Peptid (Hopp et al. (1988) Bio/Technology 6 1204-1210), das KT3 Epitop Peptid (Martinet et al. (1990) Cell 63, 843-849; Martin et al. (1992) Science 255, 192-194) und das alpha-tubulin Epitop Peptid (Skinner et al. (1991) J. Biol. Chem. 266, 14163-14166), die alle erfolgreich für die Detektion und teilweise auch für die Reinigung von Proteinen genutzt wurden. Es konnte für einen Teil der Fusionspartner, die normalerweise 3 bis 12 Aminosäuren lang sind, gezeigt werden, daß sie nicht die biologische Funktion der definierten Proteine beeinflussen. Die biologische Funktion des definierten Proteins wird dagegen mit zunehmender Länge des Fusionspartners beeinflußt, da die zusätzlich exprimierten Aminosäuren z. B. die Ausbildung der Sekundär-, Tertiär und/oder Quartärstruktur beeinflussen können. Längere Fusionspartner sind daher zur Detektion der Proteine, aber weniger zur Reinigung der Proteine geeignet. Auf der anderen Seite weisen längere Fusionspartner oft eine höhere Affinität mit ihren spezifischen Bindungspartnern auf.

Ein wesentlicher Nachteil der oben genannten Fusionspartner bei der Aufreinigung ist darin begründet, daß die Bindung an den Bindungspartner auf einer Antigen/Antikörperbindung beruht und die Herstellung und Reinigung der als Bindungspartner genutzten Antikörper aufwendig und teuer ist. Ein weitere Nachteil liegt darin begründet, daß die Antigen/Antikörperbindung eine sehr starke Bindung

zwischen dem Bindungspartner, z. B. an eine Matrix immobilisierten Antikörper, und dem Fusionspartner bedingt. Diese hat zur Folge, daß bei der Elution der über den Fusionspartner gebundenen Fusionsproteine, teilweise extrem 5 unphysiologische Bedingungen bezogen auf das definierte Protein geschaffen werden müssen. Unter unphysiologischen Bedingungen sind in diesem Zusammenhang Bedingungen zu verstehen mit z. B. sehr hohe oder äußerst geringe Salzkonzentrationen, Einsatz von chaotrophen Salzen und pH- 10 Werte, die weit von dem natürlichen pH-Wert des definierten Proteins abweichen. Diese kann u. U. die Struktur und/oder Funktionalität des definierten Proteins beeinflussen oder irreversibel zerstören. Dementsprechend sollte die Reinigung der definierten Proteine unter möglichst 15 schonenden, physiologischen Bedingungen geschehen, um die Funktionalität der Proteine zu erhalten. Zwar konnte bei drei der oben genannten Fusionspartnern (Hopp et al. 1988) (Martin et al. 1990) (Skinner et al. 1991)) eine Elution auch unter schonenden Bedingungen mittels 20 kompetetiver Peptide erzielt werden, doch bleibt das Problem der aufwendig und teuer herzustellenden und zu reinigenden (als Bindungspartner dienenden) Antikörper und deren Bindung an die Matrix.

25 Weitere Fusionspartner, bestehend aus 8 bis 9 Aminosäuren, sind aus den Literaturstellen US 5,506,121 und Schmidt & Skerra (Protein Engineering, vol. 6, no. 1, 109-122, 1993) bekannt. Die dort offenbarten Fusionspartner sind in der Lage an das Streptavidin oder an das "core" Streptavidin, 30 ein proteolytisch gespaltenes Produkt des Streptavidin, zu binden (Bayer et al. (1989) Biochem. J. 259, 369-376).

Alle bekannten Fusionspartner, die an das Streptavidin binden enthalten die Aminosäureabfolge HPQ, das sog. HPQ-Bindungsmotiv, welches mit der Biotin-Bindungstasche des Streptavidin in Wechselwirkung tritt. Zu den Bereits bekannten Peptiden gehören dem sog. Strep-tag I: AWRHPQFGG mit einer Dissoziationskonstanten  $K_d$  von 10-37  $\mu\text{M}$ , der sog. Strep-tag II: WSHPQFEK mit einer Dissoziationskonstanten  $K_d$  von 18-72  $\mu\text{M}$  und der sog. SBP-tag: MDEKTTGWRGGHVVEGLAGELEQLRARLEHHHPQQQREP mit einer Dissoziationskonstanten  $K_d$  von 2,5 nM. Im Gegensatz zu den beiden kurzen Strep-tags I und II besitzt der längere SBP-tag eine wesentlich stärkere Bindung zum Streptavidin. Allerdings wird, wie oben ausgeführt, die Funktion des definierten Proteins insbesondere mit zunehmender Länge des Fusionspartners beeinflußt. Auch stören besonders lange Fusionspartner bei der Kristallisation der definierten Proteine.

## 20 Technisches Problem der Erfindung

Der Erfindung liegt das technische Problem zugrunde, ein möglichst kurzes Streptavidin-Bindungspeptid mit einer starken Bindung zum Streptavidin zur Verfügung zu stellen.

## Grundzüge der Erfindung und bevorzugte Ausführungsformen.

30

Zur Lösung des technischen Problems lehrt die Erfindung ein Streptavidin-Bindungspeptid enthaltend eine oder bestehend aus einer Aminosäuresequenz gemäß Seq.-ID 1 - 12.

Mit dem erfindungsgemäßen Streptavidin-Bindungspeptid enthaltend eine Aminosäuresequenz gemäß Seq.-ID 1 - 12 wird, verglichen mit dem Stand der Technik, eine wesentlich 5 stärkere Bindung zwischen dem Streptavidin-Bindungspeptid und dem Streptavidin erreicht, bzw. kann bei gleicher Bindungsstärke das Streptavidin-Bindungspeptid wesentlich verkürzt werden.

10 Des Weiteren lehrt die Erfindung ein Nukleinsäure codierend für ein Streptavidin-Bindungspeptid gemäß Seq.-ID 1 - 12, sowie ein Plasmid enthaltend eine erfindungsgemäße Nukleinsäure. Es versteht sich, daß die Nukleinsäure codierend für ein erfindungsgemäßes Streptavidin-Bindungs- 15 peptid und/oder das Plasmid dem jeweiligen Expressionssystem/Proteinbiosynthesesystem angepaßt werden kann. Das Plasmid kann als ein Expressionsvektor, insbesondere für Bakterien, ausgelegt sein enthaltend einen Bereich mit mindestens einer Schnittstelle für ein Restriktionsenzym, 20 in dem die Nukleinsäuresequenz codierend für ein definiertes Protein inseriert werden kann und somit das definierte Protein zusammen mit dem Streptavidin-Bindungspeptide gemäß Seq.-ID 1 - 12 exprimiert wird. Es versteht sich, daß der für das definierte Protein und für das Streptavidin- 25 Bindungspeptide gemäß Seq.-ID 1 - 12 codierende Bereich sich unter der Kontrolle eines geeigneten Promoters und/o- der Operators und Terminators befinden. Der Bereich mit mindestens einer Schnittstelle für mindestens ein Restriktionsenzym kann sowohl in 5', als auch in 3' Richtung vom 30 Nukleinsäurebereich codierend für das Streptavidin-Bindungspeptide gemäß Seq.-ID 1 - 12 liegen. Der Nukleinsäurebereich codierend für das Streptavidin-Bindungspeptide gemäß Seq.-ID 1 - 12 muß nicht unmittelbar an den

Nukleinsäurebereich codierend für das definierte Protein anschließen, vielmehr können zwischen den beiden Bereich noch Nukleinsäuren liegen, die für 1 bis 20 Aminosäuren, insbesondere für 5 bis 10 Aminosäuren, codieren.

5

Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Herstellung eines Streptavidin-Bindungspeptides gemäß Seq.-ID 1 - 12, wobei eine Nukleinsäure in einem zellbasierten oder zellfreien Proteinbiosynthesesystem exprimiert oder überexprimiert wird. Dieses so hergestellte Peptid läßt sich leicht über die Bindung an Streptavidin isolieren. Das erhaltene Translationsprodukt, i. e. ein Streptavidin-Bindungspeptid gemäß Seq.-ID 1 - 12, wird mit immobilisiertem Streptavidin kontaktiert und daran gebunden. Nach Abtrennung der Lösung mit nicht an Streptavidin gebundenen Substanzen wird das Translationsprodukt eluiert. Als Elutionsmittel können Puffer verwendet werden, die Biotin oder verwandte Substanzen und/oder Derivate, wie Iminobiotin, Desthiobiotin und/oder Diaminobiotin, enthalten. Das erhaltene Streptavidin-Bindungspeptid gemäß Seq.-ID 1 - 12 trägt im Falle der Fusion mit dem definierten Protein dieses Proteins. Es kann der auch unabhängig von einem definierten Protein zur Antikörperherstellung genutzt werden. Die erhaltenen Antikörper können z. B. zur Detektion oder zur Aufreinigung der Streptavidin-Bindungspeptide gemäß Seq.-ID 1 - 12, bzw. im Fall, daß das Streptavidin-Bindungspeptide gemäß Seq.-ID 1 - 12 als Fusionspartner eingesetzt wird, des an diesen Fusionspartner gebundenen definierten Proteins genutzt werden.

20

Es versteht sich, daß die Herstellung eines solchen Streptavidin-Bindungspeptides enthaltend eine Aminosäuresequenz gemäß Seq.-ID 1 - 12 z. B. auch mittels chemischer

Festphasensynthese, beispielseise mit einem Syntheseautomat der Firma Abimed (Langenfeld, BRD) möglich ist. Diese Methode basiert auf den Standardprotokollen der Fmoc-Chemie (Fmoc=9-fluorenylmethoxycarbonyl).

5

Die Erfindung betrifft auch die Verwendung eines Streptavidin-Bindungspeptides gemäß Seq.-ID 1 - 12 zur Aufreinigung eines in einem Proteinbiosynthesesystem hergestellten definierten Proteins, wobei eine für das definierte Protein 10 in und, hiermit verbunden, für das Streptavidin-Bindungspeptid codierende Nukleinsäure einer Transkription und/oder Translation unterworfen wird, wobei eine Lösung enthaltend das so erhaltene Translationsprodukt mit immobilisiertem Streptavidin kontaktiert und daran gebunden wird 15 und wobei nach Abtrennung der Lösung mit nicht an Streptavidin gebundenen Substanzen das Translationsprodukt eluiert wird. Die Elution kann unter schonenden Bedingungen für das definierte Protein erfolgen. Als Elutionsmittel können Puffer verwendet werden, die Biotin oder verwandte 20 Substanzen und/oder Derivate, wie Iminobiotin, Desthiobiotin und/oder Diaminobiotin, enthalten. Das hergestellte definierte Protein kann das als Fusionspartner dienende Streptavidin-Bindungspeptid gemäß Seq.-ID 1 - 12 sowohl N- und/oder C-terminal enthalten.

25

Bei Verwendung einer Streptavidin-Sepharose-Säule kann das zu untersuchende definierte Protein mittels des als Fusionspartner dienenden Streptavidin-Bindungspeptides gemäß Seq.-ID 1 - 12 an der Matrix immobilisiert und aus einem 30 Gemisch von Molekülen, z.B. einem Zelllysat, isoliert werden.

Die Erfindung betrifft auch die Verwendung eines Streptavidin-Bindungspeptides gemäß Seq.-ID 1 - 12 zur Markierung eines definierten Proteins, wobei eine für das definierte Protein und, hiermit verbunden, für das Streptavidin-Bindungspeptid codierende Nukleinsäure einer Transkription und/oder Translation unterworfen wird, wobei das so erhaltene Translationsprodukt mit einem Streptavidin-Konjugat enthaltend ein Reportermolekül kontaktiert und daran gebunden wird. Das markierte definierte Protein kann das zur 10 Markierung dienende Streptavidin-Bindungspeptides gemäß Seq.-ID 1 - 12 N- und/oder C-terminal enthalten. Reportermoleküle können z. B. radioaktive und/oder radioaktiv markierte Substanzen sein. Es versteht sich, daß das Streptavidin als solches auch radioaktiv markiert und/oder radioaktiv sein kann; in diesem Fall kann auf ein Reportermolekül verzichtet werden. Reportermoleküle können auch fluoreszierende Substanzen oder Enzyme, wie z. B. alkalische Phosphatase oder Peroxidase, sein. Durch solche mit einem Reportermolekül gekoppelte Streptavidinverbindungen lassen 20 sich beispielsweise Proteine, die das Streptavidin-Bindungspeptides gemäß Seq.-ID 1 - 12 als Fusionspartner besitzen, auf einem Western-Blot oder im ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay) nachweisen und/oder quantifizieren. Handelt es sich bei den definierten Proteinen um Bindungsproteine, können auf diese Weise auch an diese bindende andere Proteine nachgewiesen werden. Unter Bindungsproteine sind in diesem Zusammenhang Proteine zu verstehen, die selbst andere Proteine binden und/oder selber an andere Proteine binden, wie z. B. bei einer Antigen/Antikörperbindung oder bei einer Bindung eines Proteins an 25 einen Rezeptor.

Bevorzugt ist ein Streptavidin-Bindungspeptid enthaltend weniger als 30 Aminosäuren, vorzugsweise weniger als 20 Aminosäuren, höchstvorzugsweise weniger als 10 Aminosäuren.

5

Im Folgenden wird die Erfindung anhand von lediglich Ausführungsformen darstellenden Figuren sowie Beispielen näher erläutert.

10 Fig. 1: Reinigung von FABP mit Streptavidin-Bindungspeptid gemäß Motiv 3 als Fusionspartner nach zellfreier Proteinbiosynthese über eine Streptavidin-Affinitätssäule. Es wurden von jeder Fraktion eine vergleichbare Menge mittels SDS-Polyacrylamidgelektrophorese analysiert. (A) Coomassie gefärbt und (B) Autoradiogramm. Die Proben in den nummerierten Spuren sind (1) Molekulargewichtsmarker; (2) Reaktionsmischung; (3) Durchlauf der Probenauftragung; (4-6) Waschfraktionen; (7-9) Elutionsfraktionen; (10) radioaktiver Molekulargewichtsmarker.

25 Fig. 2: Reinigung von FABP mit Streptavidin-Bindungspeptid gemäß Motiv 3 als Fusionspartner nach zellfreier Proteinbiosynthese über eine StrepTactin-Affinitätssäule. Es wurden von jeder Fraktion eine vergleichbare Menge mittels SDS-Polyacrylamidgelektrophorese analysiert. (A) Coomassie gefärbt und (B) Autoradiogramm. Die Proben in den nummerierten Spuren sind (1) Molekulargewichtsmarker; (2) Durchlauf der Probenauftragung; (3-5) Waschfraktionen; (6-10) Elutionsfraktionen; (11) radioaktiver Molekulargewichtsmarker.

Beispiel 1 : erfindungsgemäße Bindungspeptide und Ver-  
gleichs-peptide mit Dissoziationskonstanten

5

In fachüblicher Weise wurde das FAB Protein (fatty acid binding protein) aus Rinderherzen *in vitro* in einem zell-freien Proteinbiosynthese mittels eines gekoppelten Transkriptions-Translationssystems exprimiert. Das exprimierte 10 FAB Protein besaß am N-Terminus jeweils ein aus fünfzehn Aminosäuren bestehendes zusätzliches Streptavidin Bindungspeptid mit unterschiedlichen Aminosäuresequenzen als Fusionspartner.

15 Zwei Bindungspeptide enthalten in ihrer Aminosäuresequenz das im Stand der Technik beschriebene HPQ-Motiv (Motiv 1 und 2) und zwei enthalten das erfindungsgemäße Streptavidin-Bindungspeptid gemäß Seq.-ID 1 - 6 (Motiv 3 und 4). Die Sequenzen der Peptide sind in der Tabelle 1 darge- 20 stellt. Zusätzlich wurden die exprimierten Proteine mit einem am C-terminus befindlichen "His-tag", bestehend aus 6 Histidinen, versehen. Die Proteine wurden mittels Affinitätschromatographie über  $\text{Ni}^{2+}$ -IDA-Agarose in fachüblicher Weise aufgereinigt. Man erkennt, dass bei gleicher Länge 25 Bindungspeptide mit einer erfindungsgemäßen Sequenz eine wesentlich niedrigere Dissoziationskonstante als ein Bindungspeptid mit HPQ-Motiv aufweist. Der Kd-Wert eines erfindungsgemäßen Bindungspeptids liegt in der Größenordnung des SBP-Tags trotz des ca. 2,5-fachen Länge des SBP-Tags.

30

Tabelle 1

	Sequenz	Dissoziationskonstante [kd]
Motiv 1	D L Y D I D R N W V G H P Q G	8 $\mu$ M
Motiv 2	D N Y D A D L A W D T H P Q D	70 $\mu$ M
Motiv 3	D V E A W L D E R V P L V E T	84 nM
Motiv 4	D V E A W I A D P A V H F T T	200 nM

10

Beispiel 2: Messungsweise der Dissoziationskonstanten aus Tabelle 1.

Die Messungen der Dissoziationskonstante wurden mit einem 15 BiacoreX-System und dem Sensor Chip NTA der Firma Biacore durchgeführt. Vermessen wurden die aus der im Beispiel 1 beschriebenen Expression hervorgegangenen Proteine, d.h. FAB Proteine, die am N-Terminus jeweils ein aus fünfzehn Aminosäuren bestehendes Peptid als Fusionspartner und am 20 C-Terminus 6 Histidine besaßen, die zur Immobilisierung auf dem Sensor Chip benötigt wurden. Die Bindungsaffinität der aus der im Beispiel 1 beschriebenen Expression hervorgegangenen Proteine zu Streptavidin wurde nach Herstellerangaben im Biacore-Gerät vermessen. Dabei befindet sich 25 das zu vermessende Protein auf dem Sensor-Chip und eine Streptavidinlösung mit definierter Konzentration wird eingespritzt. Die Wechselwirkung (Bindung) zwischen den beiden Molekülen wird vom Gerät gemessen und als sog. Resonanz Units (RU) angegeben. Zur Messung wurden die vom Hersteller 30 angegebenen Puffer verwendet.

Die Ergebnisse der Messungen sind in der Tabelle 2 dargestellt. Die erhaltenen Meßwerte wurden mit der zugehörigen

Software ausgewertet und führten zu den in der Tabelle 1 angegebenen Dissoziationskonstanten.

Tabelle 2:

5

Motiv	1	2	3	4
Streptavidinkonz.	RU	RÜ	RU	RU
15 nM			98	
30 nM			242	68
60 nM			461	171
125 nM			613	280
250 nM			704	384
500 nM	62		786	478
1 µM	123		-	560
2 µM	233		946	644
3 µM	-	64	-	
4 µM	407	-	983	
6 µM	-	98		
8 µM	621	-		
15 µM	-	201		
16 µM	779	-		
30 µM	-	337		
32 µM	955	-		
60 µM		536		

30 Beispiel 3: Aufreinigung eines Fusionsproteins

In fachüblicher weise wurde das FAB Protein, das am N-terminus ein aus fünfzehn Aminosäuren bestehendes

zusätzliches Peptide mit der Aminosäuresequenz D V E A W L D E R V P L V E T (Motiv 3) als Fusionspartner besaß, *in vitro* in einem zellfreien Proteinbiosynthese mittels eines gekoppelten Transkriptions-Translationssystems exprimiert.

5 Zur Aufreinigung des überexprimierten definierten Proteins wurde das Streptavidin an einer Festphase gekoppelt. Als Festphase diente eine Sepharose. Das exprimierte FAB Protein wurde anschließend in fachüblicher weise affinitätschromatographisch über eine Säule enthaltend Streptavidin-Sepharose oder StrepTactin-Sepharose aufgereinigt.

Für die Aufreinigung wurden folgende Puffer verwendet:

Waschpuffer (100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA).

15 Für die Elution von Streptavidin enthielt der Waschpuffer 2 mM Biotin und für die Elution von StrepTactin enthielt der Waschpuffer 2,5 mM Desthiobiotin.

Die prozentuale Verteilung des eingesetzten definierten 20 Proteins auf die verschiedenen Fraktionen der Affinitätschromatographie ist in der Tabelle 3 zu entnehmen. In der Tabelle 3 steht D für den Auftragung der Probe/Durchlauf, W für die Waschfraktion und E für die Elutionsfraktion.

25 Tabelle 3

Fraktion	D	W1	W2	W3	E1	E2	E3	E4	E5	Summe
Streptavidin	3,5%	6,8%	1,0%	0,3%	0,4%	76,9%	0,7%	-	-	89,6%
StrepTactin	3,0%	7,4%	1,8%	0,9%	0,9%	45,9%	23,2%	1,0%	0,3%	84,4%

Bei der Verwendung von Streptavidin-Sepharose konnten 90% des aufgetragenen Proteins von der Säule wiedergewonnen

werden, wobei 78% auf das Eluat entfielen. Die Qualität der Aufreinigung ist in Fig. 1 dargestellt.

Bei der Verwendung von StrepTactin-Sepharose konnten 84% des aufgetragenen Proteins von der Säule wiedergewonnen werden, wobei 71% auf das Eluat entfielen. Die Qualität der Aufreinigung ist in Fig. 2 dargestellt.

#### 10 Beispiel 4: Optimierung einzelner Bindungspeptide

Das Bindungspeptid (FAX 3) mit der Sequenz DVEAWLDERVPLVET wurde einer Substitutionsanalyse unterzogen, wodurch ein etwaiges Minimalmotiv (=verkürztes Peptid) identifiziert 15 und die Wirkung einzelner Aminosäureaustausche auf die Bindungsspezifität untersucht werden sollten. Bei einer Substitutionsanalyse werden Peptide mittels Spot-Verfahren (Frank, R. 1992) auf einer als Festphase dienenden Cellulosemembran synthetisiert. Dabei wurde jede Position des 20 15 Aminosäuren umfassenden Peptids systematisch durch die übrigen 19 L-Aminosäuren ersetzt.

Die Substitutionsanalyse wurde mit einem Peroxidase-markierten Streptavidin inkubiert und mit einem Lumineszenz-25 substrat entwickelt. Dadurch konnte festgestellt werden wie weit sich das Peptid verkürzen lässt und welche Aminosäuren "konserviert" und somit nicht oder nur sehr schlecht austauschbar sind. Es ergab sich folgendes Bild: Ein Peptid, das hinreichende Streptavidinbindung aufweist 30 ist das 6-mer Peptid DVEAWL. Eine deutliche bessere Streptavidinbindung weist das 9-mer Peptid DVEAWLDER auf. Die Substitutionsanalyse wies auch auf Positionen hin, wo der Austausch der ursprünglichen gegen eine andere Aminosäure

eine Verbesserung der Streptavidinbindung mit sich bringen könnte.

Die Informationen aus der Substitutionsanalyse wurden 5 überprüft, indem die Bindungskonstanten verschiedener Peptide mittels "Oberflächen Plasmonen Resonanz" Spektroskopie unter Verwendung eines BIACore-Gerätes bestimmt wurden. Die Messungen erfolgten mit dem NTA Sensor-Chip der Firma BIACore und mit Hilfe des fettsäurebindenden Pro-10 teins aus dem Rinderherzen (FABP). Das FABP diente zur Immobilisierung und Präsentation der Peptide. Weiterhin sollten so die bei einer Affinitätschromatographie auftretenden Bedingungen simuliert werden, da das Peptid zukünftig als Affinitätspeptid zur Aufreinigung von Proteinen 15 verwendet werden soll. Im Gegensatz zu den ersten Messungen, wo die zu vermessenden Peptide die vier N-terminalen Aminosäuren des FABP ersetzen, war die Anordnung der Peptide diesmal ebenfalls N-terminal, aber sie waren nicht Teil des FABP. Auch der für die Immobilisierung notwendige 20 His-tag wurde verändert. Er befand sich wie bei den ersten Messungen am C-Terminus des FABP, wurde aber von sechs auf acht Histidine erweitert und zudem durch einen aus zwei Glycinen bestehenden Linker vom FABP distanziert. Dadurch konnte die Immobilisierung der Liganden deutlich verbess-25 ert und somit die Drift der Basislinie, die aus dem Herunterwäschen des Liganden resultiert, minimiert werden. Für jede Messung wurde eine identische Menge des jeweiligen FABPs immobilisiert, die einem Anstieg der Basislinie um 1100 Resonanzeneinheiten (RU) entsprach. Als Referenz 30 diente das FABP mit dem His-tag, aber ohne N-terminales Bindungspeptid.

Die aus der optimierten Meßmethode hervorgehenden Bindungskonstanten waren folgende:

		Kd
5 Peptid (FAX 3):	D V E A W L D E R V P L V E T	<u>3,6</u> $\pm$ 0,6 nM (AspValGluAlaTrpLeuAspGluArgValProLeuValGluThr)
verkürztes Peptid (9-mer):	DVEAWLDER	<u>240</u> $\pm$ 40 nM
10 Einfluß anderer Aminosäuren auf das verkürzte 9-mer Peptid:		
3 Asp:	DVDAWLDER	<u>940</u> $\pm$ 140 nM
3 Gly:	DVGAWLDER	<u>570</u> $\pm$ 90 nM
15 6 Phe:	DVEAWFDER	nicht meßbar
6 Arg:	DVEAWRDER	nicht meßbar
7 Gly:	DVEAWLGER	<u>17</u> $\pm$ 4 nM
8 Ala:	DVEAWLDAR	<u>160</u> $\pm$ 30 nM
20 Positiven Einfluß zeigen insbesondere Glycin an Position 7 und Alanin an Position 8. Kombination dieser beiden Aminosäuren:		
verkürztes Peptid:	DVEAWLGAR	<u>17</u> $\pm$ 4 nM
25 original Peptid mit Gly7:	DVEAWLGERVPLVET	<u>4,2</u> $\pm$ 0,7 nM
original Peptid:	DVEAWLGARVPLVET	<u>4,1</u> $\pm$ 0,6 nM

Das original 15-mer Peptid lässt sich nicht weiter verbessern. Das verkürzte 9-mer Peptid hingegen lässt sich durch 30 ein Glycin anstelle der Asparaginsäure an Position sieben deutlich verbessern. Auch das Alanin anstelle der Glutaminsäure an Position acht weist eine etwas bessere Bindungsaaffinität gegenüber Streptavidin auf. Durch die

Kombination dieser beiden Aminosäuren lässt sich zwar die Bindungsaffinität nicht weiter verbessern, aber sie verschlechtert sich auch nicht.

5 Die Erfindung umfasst somit auch ein 9-mer Peptid mit seinen nicht bzw. nur wenig konservierten Positionen:

DVXAWLXXR (X= beliebige Aminosäure)

10 Zudem natürlich das verkürzte Peptid mit Glycin an Position sieben:

DVEAWLGER

und das verkürzte Peptid mit Glycin an Position sieben und 15 Alanin an Position acht:

DVEAWLGAR

Beispiel 5: Varianten erfindungsgemäßer Sequenzen.

20

Folgend werden erfindungsgemäß besonders geeignete Sequenzen angegeben.

Seq.-ID 1: DVEAW

25 Seq.-ID 2: DVEA

Seq.-ID 3: VEAW

Seq.-ID 4: DVE

Seq.-ID 5: VEA

Seq.-ID 6: EAW

30 Seq.-ID 7: DVXAW

Seq.-ID 8: DVXAWL

Seq.-ID 9: DVXAWLX

Seq.-ID 10: DVXAWLXX

Seq.-ID 11: DVXAWLXXR

Seq.-ID 12: DVXAWLXXRVPLVET

Seq.-ID 13: VPLVET

5 X an Position 3 kann beliebig, jedoch insbesondere E, D oder G sein. X kann an Position 7 beliebig, jedoch insbesondere G oder D sein. X kann an Position 8 beliebig, jedoch insbesondere A oder E sein. Sequenz 13 stellt eine optionale carboxyterminale Verlängerung der Sequenz 11 10 dar, wobei aus Sequenz 13, aminoterminal beginnend 1 bis 6 Aminosäuren an Sequenz 11 angeschlossen sein können.

15

20

25

30

## Patentansprüche:

1. Streptavidin-Bindungspeptid enthaltend eine oder bestehend aus einer Aminosäuresequenz gemäß Seq.-ID 1 - 12.

2. Nukleinsäure codierend für ein Streptavidin-Bindungspeptid nach Anspruch 1.

10

3. Plasmid enthaltend eine Nukleinsäure nach Anspruch 2.

15 4. Verfahren zur Herstellung eines Streptavidin-Bindungspeptides nach Anspruch 1, wobei eine Nukleinsäure nach Anspruch 2 in einem zellbasierten oder zellfreien Proteinbiosynthesesystem exprimiert oder überexprimiert wird.

20

25 5. Verwendung eines Streptavidin-Bindungspeptides nach Anspruch 1 zur Aufreinigung eines in einem Proteinbiosynthesesystem hergestellten definierten Proteins, wobei eine für das definierte Protein und, hiermit verbunden, für das Streptavidin-Bindungspeptid codierende Nukleinsäure, optional kontrolliert durch eine regulatorische Sequenz, einer Transkription und/oder Translation unterworfen wird, wobei eine Lösung enthaltend das 30 so erhaltene Translationsprodukt mit immobilisiertem Streptavidin kontaktiert wird und wobei nach Abtrennung der Lösung mit nicht an Streptavidin gebundenen

Substanzen von dem Streptavidin das Translationsprodukt vom Streptavidin freigesetzt und eluiert wird.

5 6. Verwendung eines Streptavidin-Bindungspeptides nach Anspruch 1 zur Markierung eines definierten Proteins, wobei eine für das definierte Protein und, hiermit verbunden, für das Streptavidin-Bindungspeptid codierende Nukleinsäure einer Transkription und/oder Translation 10 unterworfen wird, wobei das so erhaltene Translationsprodukt mit einem Streptavidin-Konjugat enthaltend eine Reportermolekül kontaktiert und daran gebunden wird.

15

20

25

30

Fig. 1

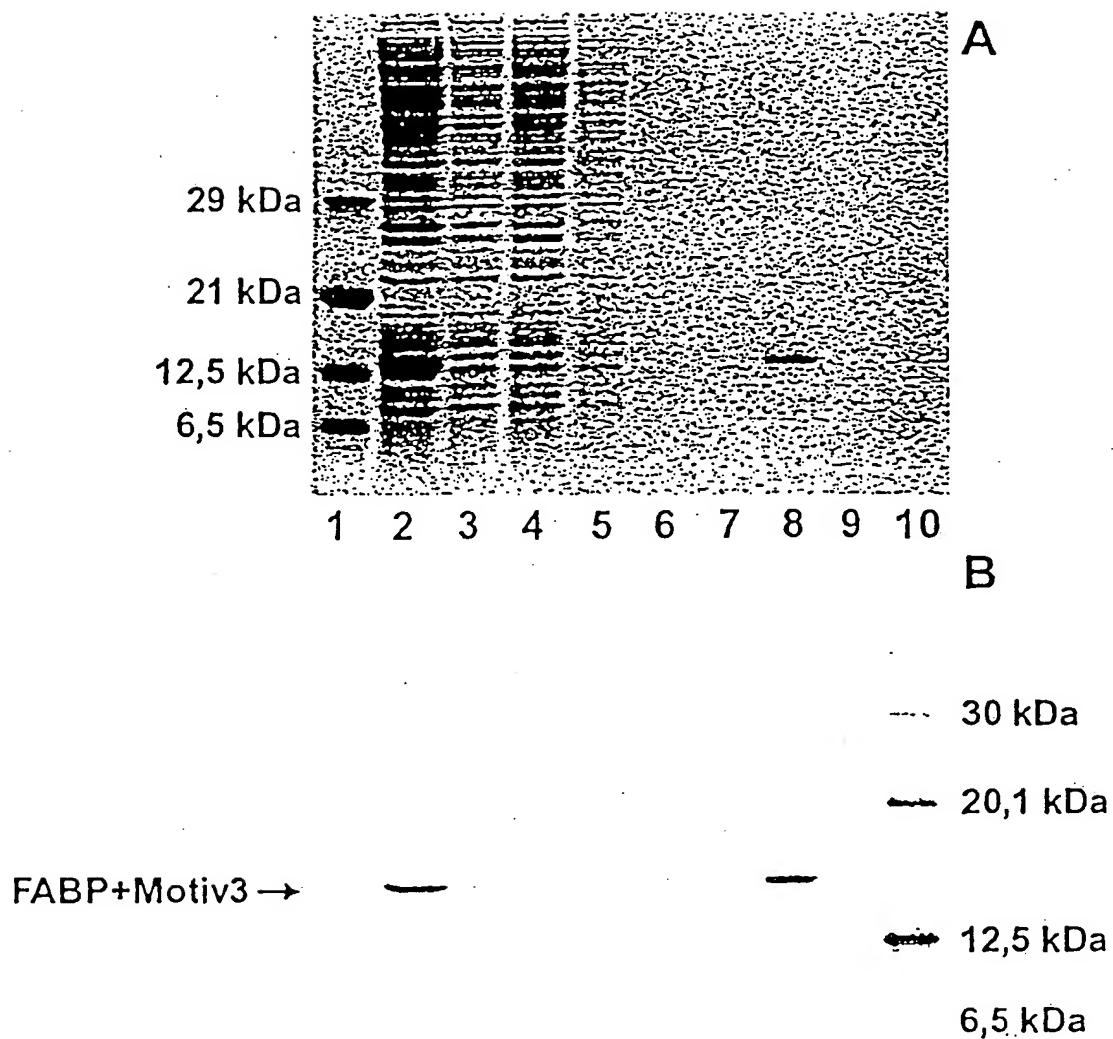
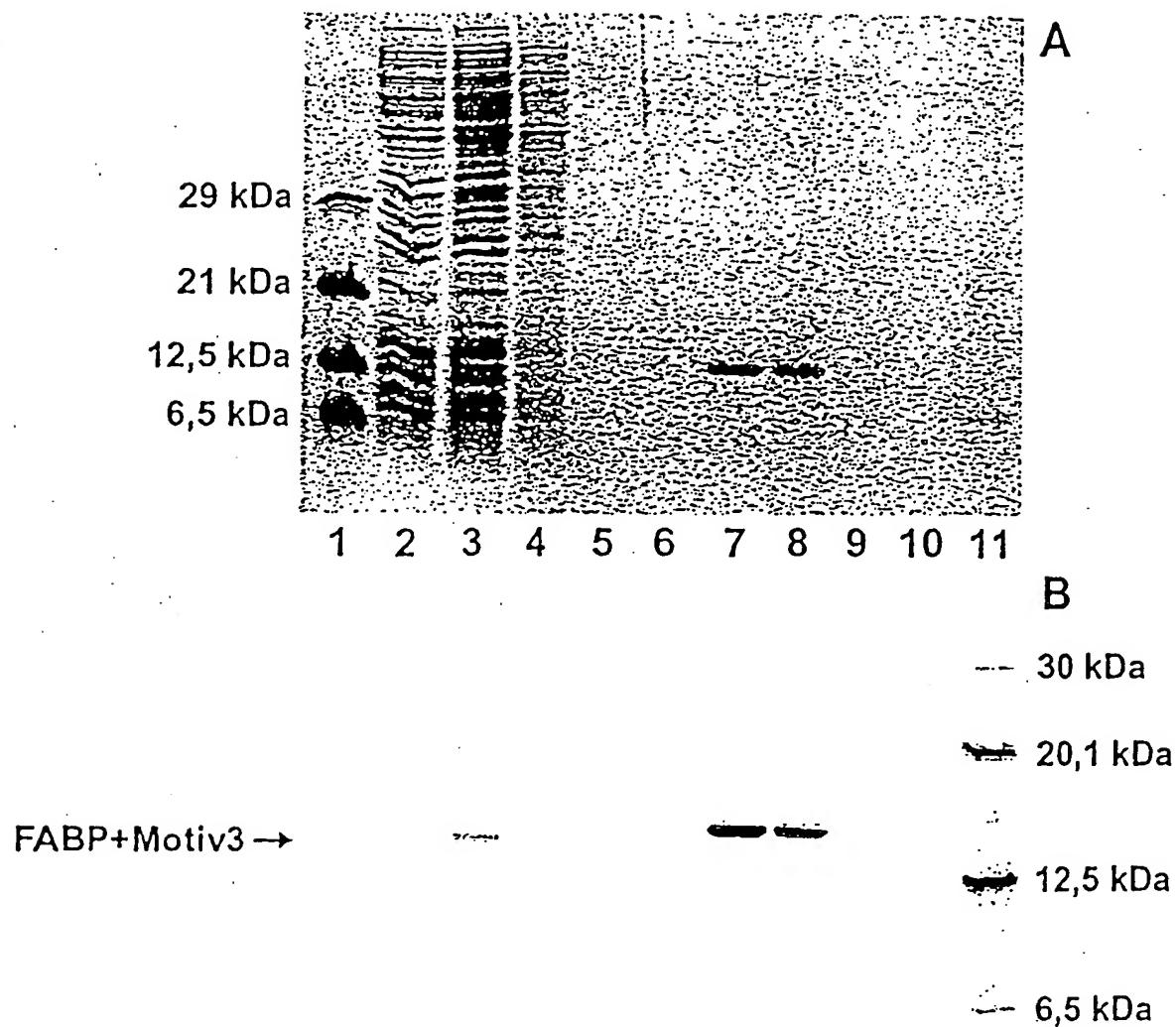


Fig. 2



## SEQUENCE LISTING

<110> Erdmann, Volker A.  
Lämla, Thorsten

<120> Steptavidin-Bindungspeptid

<130> ERD/PCT/0303

<150> DE 10208877  
<151> 2002-03-01

<150> DE 10248318  
<151> 2002-10-16

<160> 17

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> artificial

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(5)  
<223>

<400> 1

Asp Val Glu Ala Trp  
1 5

<210> 2  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> artificial

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(4)  
<223>

<400> 2

Asp Val Glu Ala  
1

<210> 3  
<211> 4

<212> PRT  
<213> artificial

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(4)  
<223>

<400> 3

Val Glu Ala Trp  
1

<210> 4  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> artificial

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(3)  
<223>

<400> 4

Asp Val Glu  
1

<210> 5  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> artificial

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(3)  
<223>

<400> 5

Val Glu Ala  
1

<210> 6  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> artificial

<220>

<221> misc\_feature  
<222> (1)..(3)  
<223>

<400> 6

Glu Ala Trp  
1

<210> 7  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> artificial

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (3)..(3)  
<223> beliebige Aminosäure, insbesondere E, D, oder G

<400> 7

Asp Val Xaa Ala Trp  
1 5

<210> 8  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> artificial

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (3)..(3)  
<223> beliebige Aminosäure, insbesondere E, D oder G

<400> 8

Asp Val Xaa Ala Trp Leu  
1 5

<210> 9  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> artificial

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (3)..(3)  
<223> beliebige Aminosäure, insbesondere E, D oder G

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (7)..(7)  
<223> beliebige Aminosäure, insbesondere D oder G

<400> 9

Asp Val Xaa Ala Trp Leu Xaa  
1 5

<210> 10  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> artificial

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (3)..(3)  
<223> beliebige Aminosäure, insbesondere E, D oder G

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (7)..(7)  
<223> beliebige Aminosäure, insbesondere D oder G

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (8)..(8)  
<223> beliebige Aminosäure, insbesondere A oder E

<400> 10

Asp Val Xaa Ala Trp Leu Xaa Xaa  
1 5

<210> 11  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> artificial

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (3)..(3)  
<223> beliebige Aminosäure, insbesondere E, D, oder G

<220>  
<221> misc\_feature

<222> (7)..(7)  
<223> beliebige Aminosäure, insbesondere D oder G

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (8)..(8)  
<223> beliebige Aminosäure, insbesondere A oder E

<400> 11

Asp Val Xaa Ala Trp Leu Xaa Xaa Arg  
1 5

<210> 12  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> artificial  
  
<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (3)..(3)  
<223> beliebige Aminosäure, insbesondere E, D oder G

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (7)..(7)  
<223> beliebige Aminosäure, insbesondere D oder G

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (8)..(8)  
<223> beliebige Aminosäure, insbesondere A oder E

<400> 12

Asp Val Xaa Ala Trp Leu Xaa Xaa Arg Val Pro Leu Val Glu Thr  
1 5 10 15

<210> 13  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> artificial  
  
<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(6)  
<223> carboxyterminal an Seq.-ID 11 anschliessende Sequenz mit 1 - 6 de  
r hier definierten Aminosäuren, beginnend aminoterminal

<400> 13

Val Pro Leu Val Glu Thr  
1 5

<210> 14  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> artificial

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(15)  
<223>

<400> 14

Asp Leu Tyr Asp Ile Asp Arg Asn Trp Val Gly His Pro Gln Gly  
1 5 10 15

<210> 15  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> artificial  
  
<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(15)  
<223>

<400> 15

Asp Asn Tyr Asp Ala Asp Leu Ala Trp Asp Thr His Pro Gln Asp  
1 5 10 15

<210> 16  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> artificial  
  
<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(15)  
<223>

<400> 16

Asp Val Glu Ala Trp Leu Asp Glu Arg Val Pro Leu Val Glu Thr  
1 5 10 15

<210> 17  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> artificial

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(15)  
<223>

<400> 17

Asp Val Glu Ala Trp Ile Ala Asp Pro Ala Val His Phe Thr Thr  
1 5 10 15



A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER				
IPC 7	C07K7/00	C07K14/00	C07K19/00	G01N33/53
		C12N15/10		

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07K C12N G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, MEDLINE, CHEM ABS Data, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 01 01748 A (GENENTECH INC) 11 January 2001 (2001-01-11) Seq ID No: 57 ---	1
X	US 6 342 581 B1 (ROSEN CRAIG A ET AL) 29 January 2002 (2002-01-29) Seq ID NO: 417 ---	1
X	WO 01 90331 A (FISCHETTI VINCENT A ;NELSON DANIEL C (US); UNIV ROCKEFELLER (US)) 29 November 2001 (2001-11-29) Peptide-3 page 32; table 1 ---	1
X	WO 99 57565 A (BLASCHUCK OREST W ;GOUR BARBARA J (CA); ADHEREX TECHNOLOGIES INC ) 11 November 1999 (1999-11-11) Seq ID NO: 255 and Seq ID NO: 258 ---	1
	-/-	

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "I" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art;

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
4 November 2003	17/11/2003
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer  Voigt, H

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
12. September 2003 (12.09.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 2003/074546 A3**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: **C07K 7/00**,  
14/00, 19/00, G01N 33/53, C12N 15/10

LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,  
MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE,  
SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,  
VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE2003/000605

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,  
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),  
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,  
TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE,  
DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL,  
PT, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI,  
CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(22) Internationales Anmeldedatum:  
20. Februar 2003 (20.02.2003)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
102 08 877.2 1. März 2002 (01.03.2002) DE  
102 48 318.3 16. Oktober 2002 (16.10.2002) DE

Veröffentlicht:  
— mit internationalem Recherchenbericht

(71) Anmelder und  
(72) Erfinder: ERDMANN, Volker, A. [DE/DE]; Argentinische Allee 2, 14163 Berlin (DE). LAMLA, Thorsten [DE/DE]; Thielallee 63, 14195 Berlin (DE).  
(74) Anwälte: JUNGBLUT, Bernhard usw.; Albrecht, Lüke & Jungblut, Gelfertstr. 56, 14195 Berlin (DE).  
(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen  
Recherchenberichts: 25. März 2004

(15) Informationen zur Berichtigung:  
Frühere Berichtigung:  
siehe PCT Gazette Nr. 47/2003 vom 20. November 2003,  
Section II

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

**WO 2003/074546 A3**

(54) Title: STREPTAVIDIN-BINDING PEPTIDE

(54) Bezeichnung: STREPTAVIDIN-BINDUNGSPEPTID

(57) Abstract: The invention relates to novel streptavidin-binding peptides.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung lehrt neue Streptavidin-Bindungspeptide.

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ZANG X ET AL: "Tight-binding streptavidin ligands from a cyclic peptide library" BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY LETTERS, OXFORD, GB, vol. 8, no. 17, 8 September 1998 (1998-09-08), pages 2327-2332, XP004138226 ISSN: 0960-894X page 2327, paragraph 3 page 2329, paragraph 3 -page 2330, paragraph 3 figure 1	1-6
A	OESTERGAARD S ET AL: "NOVEL AVIDIN AND STREPTAVIDIN BINDING SEQUENCES FOUND IN SYNTHETIC PEPTIDE LIBRARIES" FEBS LETTERS, vol. 362, 1995, pages 306-308, XP002949149 ISSN: 0014-5793 table 4 page 306, column 2, paragraph 3	1-6
A	DEVLIN J J ET AL: "RANDOM PEPTIDE LIBRARIES: A SOURCE OF SPECIFIC PROTEIN BINDING MOLECULES" SCIENCE, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE, US, vol. 249, 27 July 1990 (1990-07-27), pages 404-406, XP000616029 ISSN: 0036-8075 table 2 abstract	1-6
A	WILSON DAVID S ET AL: "The use of mRNA display to select high-affinity protein-binding peptides" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, WASHINGTON, US, vol. 98, no. 7, 27 March 2001 (2001-03-27), pages 3750-3755, XP002209215 ISSN: 0027-8424 abstract table 1 page 3754, column 2, paragraph 4	1-6
		-/-

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>YAMAKI E A: "High-performance liquid chromatography of peptides on a macrospherical carbon column"  JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A, ELSEVIER SCIENCE, NL, vol. 729, 1996, pages 143-153, XP002095513  ISSN: 0021-9673  No. 100  page 148; table 1</p> <p>---</p>	1
X	<p>VELAZQUEZ C ET AL: "Quantitation of lysozyme peptides bound to class II MHC molecules indicates very large differences in levels of presentation."  JOURNAL OF IMMUNOLOGY (BALTIMORE, MD.: 1950) UNITED STATES 1 MAY 2001, vol. 166, no. 9, 1 May 2001 (2001-05-01), pages 5488-5494, XP002259794  ISSN: 0022-1767  page 5489, column 1, line 6</p> <p>---</p>	1
A	<p>KAY B K ET AL: "An M13 phage library displaying random 38-amino-acid peptides as a source of novel sequences with affinity to selected targets"  GENE, ELSEVIER BIOMEDICAL PRESS.  AMSTERDAM, NL, no. 128, 1993, pages 59-65, XP002074893  ISSN: 0378-1119  page 60, column 1, paragraph 3  page 61, column 2, paragraph 3 -page 63, column 1, paragraph 3  figure 3</p> <p>---</p>	1-6
A	<p>LAMLA T ET AL: "In vitro selection of other proteins than antibodies by means of ribosome display"  FEBS LETTERS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 502, no. 1-2, 27 July 2001 (2001-07-27), pages 35-40, XP004296815  ISSN: 0014-5793  page 35, column 2, line 13 -page 36, column 1, line 5  page 39, column 2, line 24 - line 31</p> <p>---</p>	1-6
A	<p>US 5 506 121 A (SKERRA ARNE ET AL)  9 April 1996 (1996-04-09)  column 2, line 15 - line 22</p> <p>---</p> <p>-/-</p>	1-6

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)		Publication date
WO 0101748	A	11-01-2001	AU CA EP JP WO	6066900 A 2373721 A1 1189931 A2 2003503075 T 0101748 A2		22-01-2001 11-01-2001 27-03-2002 28-01-2003 11-01-2001
US 6342581	B1	29-01-2002	US US AU EP JP EP WO WO US AU EP JP WO EP US	2003022185 A1 2003064412 A1 8474398 A 1000084 A1 2002513295 T 0972030 A2 9839448 A2 9902546 A1 6420526 B1 8066798 A 1042346 A1 2002514090 T 9856804 A1 1352962 A1 2003049618 A1		30-01-2003 03-04-2003 08-02-1999 17-05-2000 08-05-2002 19-01-2000 11-09-1998 21-01-1999 16-07-2002 30-12-1998 11-10-2000 14-05-2002 17-12-1998 15-10-2003 13-03-2003
WO 0190331	A	29-11-2001	AU WO US	6340801 A 0190331 A2 2002058027 A1		03-12-2001 29-11-2001 16-05-2002
WO 9957565	A	11-11-1999	US US US AU AU AU AU CA CA WO WO EP EP JP JP US US US US US	6472367 B1 6358920 B1 2002123044 A1 751030 B2 3590699 A 759144 B2 3590799 A 2327530 A1 2328112 A1 9957565 A2 9957149 A2 1075662 A2 1075494 A2 2002513804 T 2002513937 T 2003082166 A1 2003096746 A1 2002169106 A1 6433149 B1 2002146687 A1 6569996 B1		29-10-2002 19-03-2002 05-09-2002 08-08-2002 23-11-1999 03-04-2003 23-11-1999 11-11-1999 11-11-1999 11-11-1999 11-11-1999 14-02-2001 14-02-2001 14-05-2002 14-05-2002 01-05-2003 22-05-2003 14-11-2002 13-08-2002 10-10-2002 27-05-2003
US 5506121	A	09-04-1996	DE FR GB JP	4237113 A1 2697525 A1 2272698 A , B 7076596 A		05-05-1994 06-05-1994 25-05-1994 20-03-1995

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>SCHMIDT THOMAS G M ET AL: "Molecular interaction between the Strep-tag affinity peptide and its cognate target, streptavidin"  JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, LONDON, GB, vol. 255, no. 5, 1996, pages 753-766, XP002209213  ISSN: 0022-2836  abstract</p> <p>---</p>	1-6
T	<p>LAMLA T ET AL: "Searching Sequence Space for High-affinity Binding Peptides using Ribosome Display"  JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, LONDON, GB, vol. 329, no. 2, 30 May 2003 (2003-05-30), pages 381-388, XP004454265  ISSN: 0022-2836  the whole document</p> <p>---</p>	1-6

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>YAMAKI E A: "High-performance liquid chromatography of peptides on a macrospherical carbon column". JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A, ELSEVIER SCIENCE, NL, Bd. 729, 1996, Seiten 143-153, XP002095513 ISSN: 0021-9673 No. 100 Seite 148; Tabelle 1</p> <p>---</p>	1
X	<p>VELAZQUEZ C ET AL: "Quantitation of lysozyme peptides bound to class II MHC molecules indicates very large differences in levels of presentation." JOURNAL OF IMMUNOLOGY (BALTIMORE, MD.: 1950) UNITED STATES 1 MAY 2001, Bd. 166, Nr. 9, 1. Mai 2001 (2001-05-01), Seiten 5488-5494, XP002259794 ISSN: 0022-1767 Seite 5489, Spalte 1, Zeile 6</p> <p>---</p>	1
A	<p>KAY B K ET AL: "An M13 phage library displaying random 38-amino-acid peptides as a source of novel sequences with affinity to selected targets". GENE, ELSEVIER BIOMEDICAL PRESS, AMSTERDAM, NL, Nr. 128, 1993, Seiten 59-65, XP002074893 ISSN: 0378-1119 Seite 60, Spalte 1, Absatz 3 Seite 61, Spalte 2, Absatz 3 -Seite 63, Spalte 1, Absatz 3 Abbildung 3</p> <p>---</p>	1-6
A	<p>LAMLA T ET AL: "In vitro selection of other proteins than antibodies by means of ribosome display". FEBS LETTERS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, Bd. 502, Nr. 1-2, 27. Juli 2001 (2001-07-27), Seiten 35-40, XP004296815 ISSN: 0014-5793 Seite 35, Spalte 2, Zeile 13 -Seite 36, Spalte 1, Zeile 5 Seite 39, Spalte 2, Zeile 24 - Zeile 31</p> <p>---</p>	1-6
A	<p>US 5 506 121 A (SKERRA ARNE ET AL) 9. April 1996 (1996-04-09) Spalte 2, Zeile 15 - Zeile 22</p> <p>---</p>	1-6
		-/-

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES		
IPK 7	C07K7/00	C07K14/00
C07K19/00		
		G01N33/53
C12N15/10		

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

**B. RECHERCHIERTE GEBIETE**

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)  
IPK 7 C07K C12N G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, MEDLINE, CHEM ABS Data, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE

**C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN**

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 01 01748 A (GENENTECH INC) 11. Januar 2001 (2001-01-11) Seq ID No: 57	1
X	US 6 342 581 B1 (ROSEN CRAIG A ET AL) 29. Januar 2002 (2002-01-29) Seq ID NO: 417	1
X	WO 01 90331 A (FISCHETTI VINCENT A ; NELSON DANIEL C (US); UNIV ROCKEFELLER (US)) 29. November 2001 (2001-11-29) Peptide-3 Seite 32; Tabelle 1	1
X	WO 99 57565 A (BLASCHUCK OREST W ; GOUR BARBARA J (CA); ADHEREX TECHNOLOGIES INC ) 11. November 1999 (1999-11-11) Seq ID NO: 255 and Seq ID NO: 258	1
	-/-	

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

- \* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

- "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
4. November 2003	17/11/2003
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bediensteter  Voigt, H

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
T	LAMLA T ET AL: "Searching Sequence Space for High-affinity Binding Peptides using Ribosome Display" JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, LONDON, GB, Bd. 329, Nr. 2, 30. Mai 2003 (2003-05-30), Seiten 381-388, XP004454265 ISSN: 0022-2836 das ganze Dokument -----	1-6

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	ZANG X ET AL: "Tight-binding streptavidin ligands from a cyclic peptide library" BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY LETTERS, OXFORD, GB, Bd. 8, Nr. 17, 8. September 1998 (1998-09-08), Seiten 2327-2332, XP004138226 ISSN: 0960-894X Seite 2327, Absatz 3 Seite 2329, Absatz 3 -Seite 2330, Absatz 3 Abbildung 1 ---	1-6
A	OESTERGAARD S ET AL: "NOVEL AVIDIN AND STREPTAVIDIN BINDING SEQUENCES FOUND IN SYNTHETIC PEPTIDE LIBRARIES" FEBS LETTERS, Bd. 362, 1995, Seiten 306-308, XP002949149 ISSN: 0014-5793 Tabelle 4 Seite 306, Spalte 2, Absatz 3 ---	1-6
A	DEVLIN J J ET AL: "RANDOM PEPTIDE LIBRARIES: A SOURCE OF SPECIFIC PROTEIN BINDING MOLECULES" SCIENCE, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE,, US, Bd. 249, 27. Juli 1990 (1990-07-27), Seiten 404-406, XP000616029 ISSN: 0036-8075 Tabelle 2 Zusammenfassung ---	1-6
A	WILSON DAVID S ET AL: "The use of mRNA display to select high-affinity protein-binding peptides" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON, US, Bd. 98, Nr. 7, 27. März 2001 (2001-03-27), Seiten 3750-3755, XP002209215 ISSN: 0027-8424 Zusammenfassung Tabelle 1 Seite 3754, Spalte 2, Absatz 4 ---	1-6
A	SCHMIDT THOMAS G M ET AL: "Molecular interaction between the Strep-tag affinity peptide and its cognate target, streptavidin" JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, LONDON, GB, Bd. 255, Nr. 5, 1996, Seiten 753-766, XP002209213 ISSN: 0022-2836 Zusammenfassung ---	1-6
		-/-

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung		Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 0101748	A	11-01-2001	AU CA EP JP WO	6066900 A 2373721 A1 1189931 A2 2003503075 T 0101748 A2		22-01-2001 11-01-2001 27-03-2002 28-01-2003 11-01-2001
US 6342581	B1	29-01-2002	US US AU EP JP EP WO WO US AU EP JP WO EP US	2003022185 A1 2003064412 A1 8474398 A 1000084 A1 2002513295 T 0972030 A2 9839448 A2 9902546 A1 6420526 B1 8066798 A 1042346 A1 2002514090 T 9856804 A1 1352962 A1 2003049618 A1		30-01-2003 03-04-2003 08-02-1999 17-05-2000 08-05-2002 19-01-2000 11-09-1998 21-01-1999 16-07-2002 30-12-1998 11-10-2000 14-05-2002 17-12-1998 15-10-2003 13-03-2003
WO 0190331	A	29-11-2001	AU WO US	6340801 A 0190331 A2 2002058027 A1		03-12-2001 29-11-2001 16-05-2002
WO 9957565	A	11-11-1999	US US US AU AU AU AU AU AU CA CA WO WO EP EP JP JP US US US US US	6472367 B1 6358920 B1 2002123044 A1 751030 B2 3590699 A 759144 B2 3590799 A 2327530 A1 2328112 A1 9957565 A2 9957149 A2 1075662 A2 1075494 A2 2002513804 T 2002513937 T 2003082166 A1 2003096746 A1 2002169106 A1 6433149 B1 2002146687 A1 6569996 B1		29-10-2002 19-03-2002 05-09-2002 08-08-2002 23-11-1999 03-04-2003 23-11-1999 11-11-1999 11-11-1999 11-11-1999 11-11-1999 14-02-2001 14-02-2001 14-05-2002 14-05-2002 01-05-2003 22-05-2003 14-11-2002 13-08-2002 10-10-2002 27-05-2003
US 5506121	A	09-04-1996	DE FR GB JP	4237113 A1 2697525 A1 2272698 A ,B 7076596 A		05-05-1994 06-05-1994 25-05-1994 20-03-1995